

## オキシトシン受容体機能の分子遺伝学的解析

著者	高柳 友紀
号	814
発行年	2004
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16507">http://hdl.handle.net/10097/16507</a>

氏 名(本籍)	たか 高	やなぎ 柳	ゆ 友	き 紀
学 位 の 種 類	博 士 ( 農 学 )			
学 位 記 番 号	農 博 第 8 1 4 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学 位 論 文 題 目	オキシトシン受容体機能の分子遺伝学的解析			
論文審査委員	(主 査)	教 授	西 森 克 彦	
	(副 査)	教 授	佐 藤 英 明	
		教 授	中 島 佑	

# 論文内容要旨

## 第一章 序論

オキシトシン(OT)は哺乳動物の持つ9アミノ酸からなるペプチドホルモンで、主に視床下部の室傍核(PVN)や視索上核(SON)で合成されて下垂体後葉から血中に放出される。また、その他の脳内領域の神経細胞からの OT 分泌も知られ、これが脳内の OT 機能に働くと考えられている。

また、その受容体(OTR)は7回膜貫通領域を有する G タンパク質共役型受容体ファミリーに属している。OTR には G タンパク質として  $G_{\alpha_{q/11}}$  と  $G_{\alpha_i}$  が共役し、主にリガンド刺激後のシグナル伝達として PLC(ホスホリパーゼ C)が活性化されて細胞内  $Ca^{2+}$  動員系が作動する。OTR は子宮・乳腺・卵巣・精巣などの生殖器官の他、脳、腎臓、心臓、脂肪組織などに広く発現する事が知られる。

OT は分娩時の子宮筋収縮や乳腺平滑筋収縮による乳汁射出などの生殖機能に働く事が古くから示されてきたが、最近になって生殖行動・母性行動・社会行動(個体識別記憶・集団形成など)・摂食行動・ストレス反応などの多様な脳高次機能をも制御する事が知られてきた。しかし、当研究室西森らが作製した OT 遺伝子欠損マウス( $Ot^{-/-}$ )では乳汁射出・個体識別記憶にのみ異常が観察され、以前の報告と異なる結果となった。これに加えて、*in vitro* の実験で OT と構造の類似した下垂体後葉ホルモンのバソプレシン(AVP)が OTR に結合して部分的にアゴニストとして作用する事が示されている事などから、生体でも AVP を含む他のリガンドが OTR を活性化する可能性が考えられ、上記の OT の機能においては OTR の重要性が一般的な見解となっている。

そこで、本研究は OTR 遺伝子欠損マウス( $Otr^{-/-}$ )の作製により、生体における OT/OTR システムの役割を解明する事を目的とした。

## 第二章 OTR 遺伝子欠損マウスの作製

OTR は様々な組織で発現し、多くの生体機能を担っている事が示唆されていたため、Cre-loxP システムを用いて条件特異的に遺伝子欠損を誘導できるマウスの作製を計画した。

マウス OTR 遺伝子は四つのエキソンからなり、第三・第四エキソンがアミノ酸をコードしている(Fig.1)。第三エキソンは第六膜貫通領域までを含み、その直後に 12kb 程度の大きなイントロンが存在する。大阪大学木村正博士より譲渡いただいたファージクローンより第三イントロンの途中までを含む OTR ゲノムを単離し、その制限酵素切断地図を作製した。これを元に、OTR の大半をコードする第三エキソンをターゲティングするベクターを構築した (Fig.1)。

ターゲティングベクターを制限酵素消化によって直鎖にし、マウス ES 細胞 (Embryonic stem cell; 胚性幹細胞) 株 E14TG2a に対してエレクトロポレーション法により導入した。その後薬剤耐性クローンを選択し、調製したゲノム DNA のサザンブロット解析を行い、正しく相同組み換えを起こした ES クローンを二つ同定した。これを C57BL/6J マウス 3.5 日胚(胚盤胞)にマイクロインジェクションし、五匹のキメラマウスを得た。これらの試し交配を行ったところ、一匹のキメラマウスにおいて ES 細胞が生殖細胞系列に寄与している事が分かった。そこで、発生初期に全身で Cre を発現する CAG-cre トランスジェニックマウスと得られたキメラマウスの交配を行い、*loxP* 配列に挟まれた領域が組み換えによって欠損したマウス(*Otr*<sup>-/-</sup>)を取得した。

更に、*Otr*<sup>+/-</sup>同士の交配によって得られた仔マウスの遺伝子型をサザンブロット解析によって決定し(Fig.2)、*Otr*<sup>+/-</sup>が雌雄共にメンデルの法則に従って産まれる事を確認した[(*Otr*<sup>+/+</sup>:*Otr*<sup>+/-</sup>:*Otr*<sup>-/-</sup>), 65:133:69 (males); 79:133:78 (females)]。また、第三エクソンをプローブにしたサザンブロット解析で、*Otr*<sup>+/-</sup>で Cre-*loxP* システムによって標的部位が欠損している事を改めて確認した(Fig.2)。

更に、OTR mRNA の発現上昇が知られる出産直前子宮のノーザンブロット解析を行った(Fig.2)。これによって *Otr*<sup>+/-</sup>で OTR 遺伝子の転写産物が完全に欠損し、遺伝子欠損マウスの作製に成功した事が示された。以降このマウスの解析を進める事とした。

### 第三章 OTR 遺伝子欠損マウスの生殖機能の解析

OTR は雌の分娩・乳汁射出・卵巢機能(黄体形成や卵成熟)、雄の精子形成・射精、更に雌雄の性行動など広く生殖機能に役割を果たす事が明らかとなっている。そこで、OTR 遺伝子欠損マウスにおいてこれらの機能を解析するために、雌雄 *Otr*<sup>+/+</sup>, *Otr*<sup>+/-</sup>を各々組み合わせて交配実験を行った。この際、雌については性周期を考慮せず、無作為に選択した。この結果、交配率・妊娠率・出産仔数において遺伝子型による差は認められなかった(Table.1)。これにより、*Otr*<sup>+/-</sup>では雌の卵形成・性周期・排卵・受精・着床・妊娠、雄の精子形成・射精、雌雄の性行動において顕著な異常はない事が示された。更に、妊娠雌マウスの出産について観察を行ったところ、予想外にも *Otr*<sup>+/-</sup>における分娩の開始時間や所用時間に異常は認められず、*Ot*<sup>+/-</sup>と同様の結果が得られた(Table.2)。これにより、OTR はマウスの分娩に必須ではない事が明らかとなった。

しかし、現在までに OTR と分娩の関連については大変多くの報告がなされ、また臨床の場において OT が子宮収縮剤として用いられている事からも、やはり OTR は分娩時の子宮収縮に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで *Otr*<sup>+/-</sup>の分娩機能が他因子によって相補されている可能性を疑った。

マウスの子宮収縮に重要な因子としては OT の他にプロスタグランジン  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), プロスタグランジン  $E_2$  ( $PGE_2$ ) が挙げられる。しかし、 $PGF_{2\alpha}$  の受容体 (FP),  $PGE_2$  の受容体 (EP1, EP2, EP3, EP4) の各遺伝子欠損マウスでは全て分娩時の子宮収縮に異常はない事が示されている。そのため、それぞれの因子が互いに相補可能であり、これらの分娩機能を維持している可能性が考えられている。

FP 遺伝子欠損マウス ( $Fp^{-/-}$ ) は卵巣黄体から分泌されるプロゲステロンが低下しないために、分娩を正常に開始できない。しかし、分娩直前の卵巣切除によって強制的にプロゲステロンを低下させると、正常な分娩が開始される。卵巣切除によって分娩が回復する事から、このマウスの子宮収縮機能に異常はなかったと考えられる。プロゲステロンは子宮の OTR 遺伝子発現を抑制しており、卵巣切除によってその発現が誘導された事から  $Fp^{-/-}$  の子宮収縮には OTR が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

これらの事から、FP・OT 両遺伝子欠損マウス ( $Fp^{-/-} / Ot^{-/-}$ ), FP・OTR 両遺伝子欠損マウス ( $Fp^{-/-} / Otr^{-/-}$ ) を作製し、 $Ot^{-/-}$ ,  $Otr^{-/-}$  の分娩における FP の相補作用の有無について検討を行う事とした。 $Fp^{-/-}$  は京都大学杉本幸彦博士にご供与いただいた。

$Fp^{-/-} / Ot^{-/-}$ ,  $Fp^{-/-} / Otr^{-/-}$  について分娩を観察したところ、 $Fp^{-/-}$  同様に分娩が正常に開始されず、後に死亡した胎児が排出された (Table.3)。これらについて出産予定日に帝王切開を行うと仔は生きて産まれ、里親に預ける事によって正常に成長出来る事を確認した。そのため、この分娩機能の異常は母親側の問題によるもので、 $Fp^{-/-}$  同様にプロゲステロン低下の欠失に起因する事が示唆された。

そこで、これらに対して分娩直前にプロゲステロン受容体のアンタゴニスト RU486 を投与し、その効果を観察した。 $Fp^{-/-}$  と同様に、 $Fp^{-/-} / Ot^{-/-}$ ,  $Fp^{-/-} / Otr^{-/-}$  は出産予定日付近に分娩を開始し、仔が生きて産まれる事を確認した (Table.4)。これによって FP, OT/OTR が両方無くともプロゲステロンの低下は分娩開始を誘導できる事が明らかとなった。また、マウスの分娩時のプロゲステロン低下は、子宮筋 OTR の発現誘導ではない他のシステムによって分娩開始を誘導している事が明らかとなった。

しかし、興味深い事に多くの  $Fp^{-/-} / Ot^{-/-}$ ,  $Fp^{-/-} / Otr^{-/-}$  に分娩所用時間の延長が認められた (Table.4)。そこで、分娩開始 24 時間後に開腹し、その時点までに分娩を完了できていない個体の割合を評価した (Fig.3)。その結果、 $Fp^{-/-} / Ot^{-/-}$ ,  $Fp^{-/-} / Otr^{-/-}$  では分娩の完了に 24 時間以上を要する個体が 70% 程度と非常に高い割合で認められ、子宮内に残された仔は全て死亡していた。これにより、子宮筋における FP と OT/OTR は分娩開始誘導には必須でないが分娩時の子宮筋収縮に相補的に働き、分娩を正常に終了させるために必須である事が明らかとなった。

一方で、 $Otr^{-/-}$  の仔は生きて産まれるが消化器官に乳汁が入っておらず、出産後 24 時間までに全て死亡する事が明らかとなった (Table.2)。これらの母親より産まれた仔は  $Otr^{+/+}$  に育てさせると正常に成育する事から、この原因は母親の授乳にある事が示

唆された。そこで、妊娠期(妊娠 15 日目)・授乳期(出産後 12 時間)の *Otr*<sup>+/+</sup>の乳腺を観察し、その形態や妊娠・分娩に伴う発達の異常の有無について検討を行った。

乳腺は乳頭から放射状に延びる不定形の腺葉からなる複合管状胞状腺である。それぞれの腺葉には乳管があり、これらが乳頭に開口している。各腺葉の終末にはブドウの房状の腺胞が存在し、これを筋上皮細胞が籠状に取り囲んでいる。腺胞の内側には一層の上皮細胞が並んでおり、腺胞腔を取り囲んでいる。乳腺上皮細胞は乳汁を合成し、筋上皮の収縮作用によって乳汁が乳管に分泌される。

組織切片で乳腺腺胞を観察したところ、妊娠 15 日目に顕著な差は認められなかったが、出産後 12 時間の *Otr*<sup>-/-</sup>で *Ot*<sup>-/-</sup>同様に、形成された乳汁が排出されていない様子が認められた(Fig.4, C and D)。また Whole mount の観察結果でも、妊娠 15 日目ではその乳管や腺胞について顕著な差は認められなかった。しかし、出産後 12 時間では *Otr*<sup>-/-</sup>において乳管が見えないほどに腺胞の密度が高くなっている様子が見受けられた(Fig.4, I and J)。腺胞が膨らんでいる様子が観察されたことから切片の結果とあわせて、乳汁が *Otr*<sup>-/-</sup>の腺胞内に蓄積している事がこの原因と推測された。OTR 遺伝子は乳腺の筋上皮細胞に発現する事が知られ、また *Ot*<sup>-/-</sup>では OT 投与によって射乳機能が回復する事などからも、*Otr*<sup>-/-</sup>でも乳腺筋上皮細胞の収縮機能が OT/OTR によって損なわれているものと考えられた。

#### 第四章 OT, OTR 各遺伝子欠損マウスを用いた母子親和行動における OTR の機能解析

OT/OTR は様々な動物種で、母性行動に関わる事が示されてきている。特にラットや羊では、分娩時の OT/OTR システムの活性化が母性行動を誘導する事が明らかとなっている。しかし、マウスにおいては妊娠や分娩などの刺激を伴わない未経産の状態でも自発的な母性行動が見られるため、マウスの母性行動には OT/OTR システムは必要ではないと考えられてきた。

しかし、出産直後の *Otr*<sup>-/-</sup>で仔マウスを巣内または巣外に散らかしている様子が見られたため、その母性行動の解析を行う事とした。齧歯類の母性行動は retrieving(巣から離れた仔の超音波発声を検知して、口にくわえて連れ戻す), nest building(床敷きを利用して通常の寝るための巣よりも大きな高い壁のある巣を作る), licking and grooming(排尿促進や毛繕いのために仔をなめる), crouching(哺乳や保温のために仔をお腹の下に抱える) の様な典型的な行動として現れる。これらのうち特に retrieving と crouching に着目して解析を行った。

*Otr*<sup>+/+</sup>同士の交配より得た *Otr*<sup>+/+</sup>, *Otr*<sup>-/-</sup>について出産直後の母性行動を解析した。まず test 前にケージを触らない状態での行動を 20 分間観察した。*Otr*<sup>+/+</sup>, *Otr*<sup>-/-</sup>共に crouching の持続時間は同等であったが、出産後 *Otr*<sup>-/-</sup>で散らかっている仔の割合が

高い事がわかった(Fig.5)。20 分の観察後に仔マウスを取り除き、ケージ内の巣以外の三つの角に生後 1-3 日のマウスを一匹ずつおいて、その後 30 分間の母性行動について評価を行った。*Otr*<sup>-/-</sup>は三匹の retrieving を完了するまでの時間が *Otr*<sup>+/+</sup>に比べて有意に遅い様子が見られた上に、crouching 行動の現れる時間も *Otr*<sup>+/+</sup>に比べて遅く、その持続時間も短い事が分かった(Fig.6)。ところが、*Otr*<sup>+/+</sup>, *Otr*<sup>-/-</sup>共に仔マウスのニオイを嗅ぎに行く行動が現れるまでの時間に差はない(Fig.6)ため、*Otr*<sup>-/-</sup>でみられたこの現象は嗅覚の異常によるものではない事が示された。

しかし、*Otr*<sup>-/-</sup>では乳汁が出ない事や OT が妊娠・分娩時に重要なホルモンである事から、出産後の *Otr*<sup>-/-</sup>ではこれらの影響で母性行動に異常が出た可能性も考えられる。そこで、*Otr*<sup>-/-</sup>同士の交配由来の *Otr*<sup>+/+</sup>, *Otr*<sup>-/-</sup>について、妊娠・分娩・授乳を経験していない7-9週齢の未経産時に母性行動を観察したところ、未経産 *Otr*<sup>-/-</sup>は出産後 *Otr*<sup>-/-</sup>同様に母性行動に異常を示した(Fig.7)。これによって、OTR は妊娠・分娩による生理学的変化や射乳機能の欠損とは無関係に、マウスの母性行動に重要な役割を果たす事が明らかとなった。

更に *Otr*<sup>-/-</sup>の母性行動異常の原因を探るため、ラットで母性行動に重要と考えられ、OTR が発現している脳の領域(Lateral Septum(LS), Medial Preoptic Area(MPOA))における神経細胞の活性を検討した。未経産マウスを仔と五分開対面させ、これによって誘起される神経細胞の興奮について神経活動マーカーである転写因子 c-Fos の免疫組織化学法によって解析を行った。この結果、*Otr*<sup>-/-</sup>について LS, MPOA における c-Fos 陽性細胞の数が *Otr*<sup>+/+</sup>と比較して明らかに少ない様子が認められた(Fig.8)。これによって、OTR は母性行動誘導時の LS, MPOA における神経細胞の興奮に重要な役割を果たす事が示された。

一方でリガンドの *Ot*<sup>-/-</sup>と比較するため、*Ot*<sup>-/-</sup>同士の交配によって得た *Ot*<sup>+/+</sup>, *Ot*<sup>-/-</sup>についても同様に母性行動の解析を行った。しかし意外な事に、出産後・未経産共に *Ot*<sup>-/-</sup>は *Ot*<sup>+/+</sup>と同様の正常な母性行動を示す事が明らかとなった(Fig.9-11)。

リガンドと受容体の遺伝子欠損マウスで異なる表現型を示す理由を推測し、[(1)胎児期に母親の OT が胎盤を通じて胎児に作用して後の行動を確立している (2)OTR を活性化する別のリガンドが存在する]の二つの仮説をたてた。当研究室では現在までに、胎児期の OT 暴露によって雄の攻撃性が制御されている事や、AVP が OTR を介してマウス子宮筋収縮に働く事など上記仮説を支持する研究結果を得ている。そこで、これらの内(1)胎児期の OT 暴露に着目して解析を行った。即ち、*Ot*<sup>-/-</sup>同士の交配によって母胎に OT が存在しない状況を作り、そこで成育した *Ot*<sup>-/-</sup>の母性行動の検討を行う事とした。

*Ot*<sup>+/+</sup>, *Ot*<sup>-/-</sup>同士の交配から得た仔を C57BL/6J を里親にして育てさせ、7-9 週齢の未経産マウスの母性行動を観察した。しかし、雄の攻撃性とは異なり、*Ot*<sup>-/-</sup>から産まれた *Ot*<sup>-/-</sup>も正常な母性行動を示す事が明らかとなった(Fig.12)。これにより、*Otr*<sup>-/-</sup>

と *Ot<sup>-/-</sup>* の母性行動における表現型の矛盾が見られた理由として、OTR を活性化する他のリガンドが存在する可能性が示唆された。これについては、今後の更なる研究による証明が必要である。

一方で Emory 大学 Larry J. Young 博士らとの共同研究で、仔マウスを母親と離れた時に母親を呼ぶために仔が発する超音波発声に着目して解析を行った。OT が超音波発声に関わる可能性は示唆されていたが、この解析によって生後 7 日の *Otr<sup>-/-</sup>* の仔で同腹子の *Otr<sup>+/+</sup>* に比べて発声数が有意に少ない事が明らかとなっている。この結果は仔の母親への接触にも OTR が機能している事を示した。

これら一連の解析によって、OTR は母子親和関係に極めて重要な因子であることが示された。

## 第五章 OTR 遺伝子欠損雄マウスの示す肥満についての解析

現在までの数々の研究により、OT/OTR が摂食抑制や脂肪細胞分化を制御する可能性が示されてきていたが、肥満病態における OT/OTR の機能についての報告はなされていなかった。そこで、当研究室では *Otr<sup>-/-</sup>* について肥満に着目して解析を行い、*Otr<sup>-/-</sup>* が雄特異的に加齢に伴って内臓脂肪型の肥満を呈する事を明らかとした。特に内臓脂肪の蓄積はヒトでも男性に多いとされ、糖尿病・高血圧・心筋梗塞といった生活習慣病の危険因子であり、その予防と治療は大きな課題となっている。そこで本研究では、*Otr<sup>-/-</sup>* の示す肥満の原因について探り、また内臓脂肪蓄積による代謝への影響を検討する事とした。

現在までに当研究室において、*Otr<sup>-/-</sup>* が寒冷条件下で体温を保つ事が出来ないという現象が見られており、褐色脂肪組織(BAT; Brown adipose tissue) の熱産生能力が低下し、エネルギー消費機構に異常を来している事が肥満の一因である可能性が示唆されている。そこで、更に *Otr<sup>-/-</sup>* の肥満の原因として考え得る摂食行動・活動量について、自治医科大学尾仲達史博士との共同研究で解析を行った。肥満がまだ顕著でない 8 週齢から、明らかな肥満を呈する 13 週齢に至るまでの *Otr<sup>+/+</sup>* と *Otr<sup>-/-</sup>* の摂食量を測定した。予想外に *Otr<sup>-/-</sup>* の一日の摂食量は測定した週齢で *Otr<sup>+/+</sup>* と差がない事が明らかとなった(Fig.13)。また、OT の分泌には日内変動が知られている事、摂食リズムと肥満との関連が示唆されている事などから、9-11 週齢の *Otr<sup>+/+</sup>* と *Otr<sup>-/-</sup>* の明期と暗期の摂食行動・活動量を各々 24 時間中モニターした。しかし、これについても遺伝子型による差は認められなかった(Fig.13,14)。

一方で、*Otr<sup>-/-</sup>* の代謝機能を見るために血中の血糖値、トリグリセライド、コレステロール、遊離脂肪酸を測定した。これらは肥満が明らかに認められる 20 週齢のマウスについて行ったが、*Otr<sup>+/+</sup>* と *Otr<sup>-/-</sup>* の示す値に差はなかった(Table.5)。また、更



に耐糖能(上昇した血糖値を正常に戻す能力)に異常が見られる可能性を考え、20 週齢マウスに対して OGTT(Oral glucose tolerance test;経口糖負荷試験)を行う事とした。その結果、*Otr*<sup>-/-</sup>は *Otr*<sup>+/+</sup>と耐糖能に差はなく正常である事が明らかとなった(Fig.15)。

これらの事から *Otr*<sup>-/-</sup>は内臓脂肪型肥満を呈するにも関わらず、代謝に顕著な異常は見られない事が明らかとなった。

## 総括

本研究では以下の事を明らかにした。

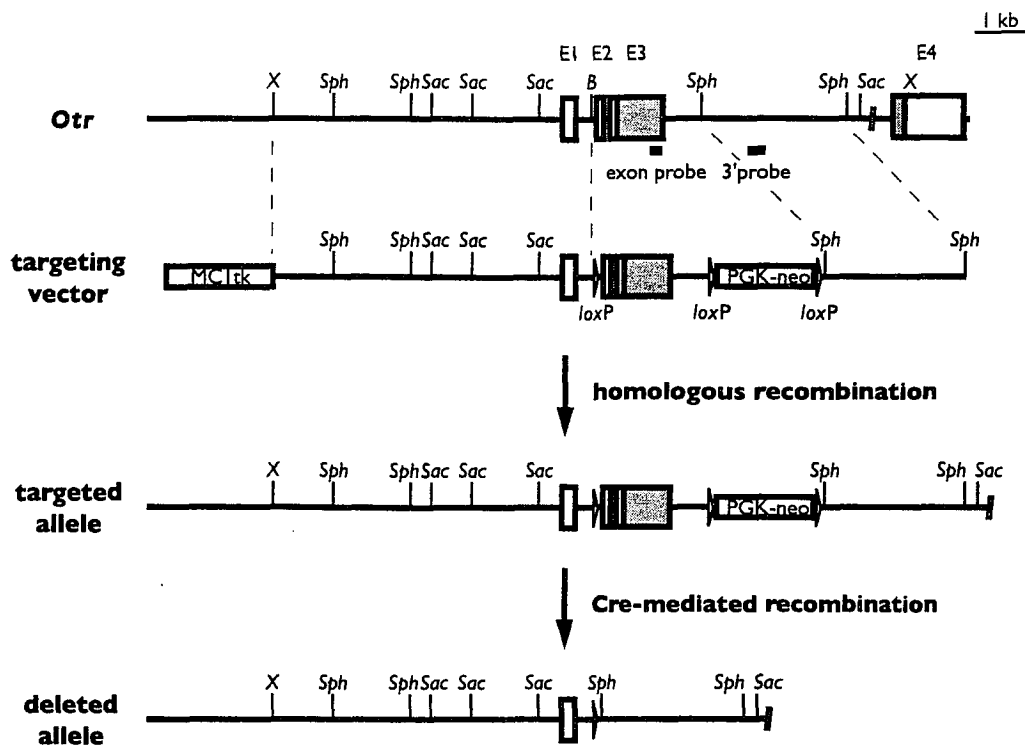
1. 雌雄 *Otr*<sup>-/-</sup>において分娩を含む生殖機能・生殖行動は正常であったが、乳汁射出機能に異常がある事を明らかにした。

2. *Fp*<sup>-/-</sup>/*Ot*<sup>+/+</sup>, *Fp*<sup>-/-</sup>/*Otr*<sup>-/-</sup>は共に自然分娩を開始出来なかったが、出産直前の RU486 投与によって OT/OTR が無くとも分娩が誘発される事を明らかにした。また、これらにおいて分娩所用時間の延長を認め、FP と OT/OTR が分娩時の子宮収縮に相補的に働いている事を強く示唆した。

3. マウスの母性行動には OT は必須でないが、OTR は必須である事を明らかにした。この原因は攻撃行動制御に見られた様な母体内での OT 暴露ではない事を示した。これにより、母性行動誘発時に OTR を活性化する他リガンドが存在する可能性を示唆した。また OTR は妊娠・分娩などによる生理的变化を経なくても母性行動誘発に根本的に機能している事を示した。*Otr*<sup>-/-</sup>では母性行動に重要な LS, MPOA における神経細胞の活性が著しく低下している事を明らかにした。

4. 雄 *Otr*<sup>-/-</sup>の肥満の原因探索として摂食量と活動量を測定し、その概日リズムを含めて *Otr*<sup>+/+</sup>と差がない事を確認した。また、*Otr*<sup>-/-</sup>は内臓脂肪型肥満を呈するため代謝異常が疑われたが、血中の血糖値・トリグリセライド値・コレステロール値・遊離脂肪酸量に *Otr*<sup>+/+</sup>との差はなく、耐糖能にも異常がない事を明らかにした。

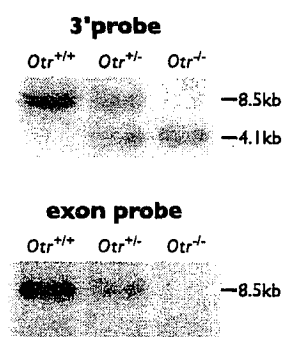
OTR 遺伝子欠損マウスの作製により、OT 遺伝子欠損マウスのみでは示されなかった新たな OT/OTR 機能が明らかとなってきた。これまでの解析により、OTR は妊娠から出産、子育て、そして成体に至るまでマウスの一生を通じて様々な重要機能を果たし、種の維持に必要不可欠なホルモン受容体であることが明らかとなった。



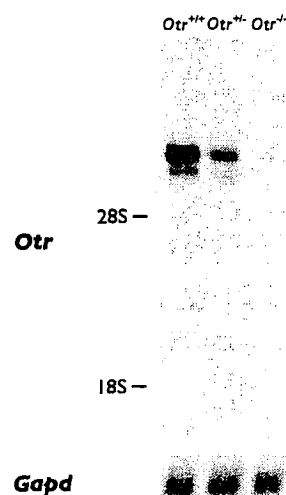
**Figure1 Structure of the *Otr* locus, targeting vector and the mutated locus.**

Exons (E) are indicated by boxes (white boxes, 5' and 3' UTRs; gray boxes, coding regions). Positions of restriction enzyme sites and the probes used for Southern-blot analysis are shown (X, XhoI; Sph, SphI; Sac, SacI; B, BamHI). The loxP sites are represented by arrowheads (not to scale). PGK-neo, phosphoglycerate kinase promoter-neomycin resistance cassette; MCI tk, thymidine kinase cassette.

#### Southern-blot analysis



#### Northern-blot analysis



**Figure2 Southern-blot analysis of tail DNA and Northern-blot analysis of *Otr* mRNA expression in the pregnant uteri from *Otr*<sup>+/+</sup>, *Otr*<sup>+/-</sup> and *Otr*<sup>-/-</sup> mice.**

Southern-blot analysis of genomic DNA from littermate progeny of *Otr*<sup>+/-</sup> matings. The probes were indicated in Figure 1. Northern-blot analysis of poly (A)<sup>+</sup> RNA from the pregnant uteri (day 19 of gestation) of *Otr*<sup>+/+</sup>, *Otr*<sup>+/-</sup> and *Otr*<sup>-/-</sup> mice. The blot was sequentially hybridized with an *Otr* probe and a *Gapd* probe.

**Table1 The profile of reproductive functions such as fertility and sexual behavior in male (10-25 weeks old) and female (10-15 weeks old) mice**

Pairing		No. of mating trials	Mating rate (%)	Pregnancy rate (%)	Average litter size
Male	Female				
<b>Otr<sup>+/+</sup> × Otr<sup>+/+</sup></b>		79	35	71	7.5±0.7
<b>Otr<sup>-/-</sup> × Otr<sup>+/+</sup></b>		63	41	65	8.2±0.9
<b>Otr<sup>+/+</sup> × Otr<sup>-/-</sup></b>		43	42	67	8.6±0.5
<b>Otr<sup>-/-</sup> × Otr<sup>-/-</sup></b>		82	33	59	8.4±0.8

Mating rate was calculated as the number of females with copulation plugs/number of total females intercrossed, which were selected without reference to ovulatory cycle. Pregnancy rate was calculated as the number of females with successful delivery/ the total number of females with copulation plugs. The data represents mean ± SEM.

**Table2 The profile of reproductive functions such as parturition and maternal nurturing in pregnant mice**

Pairing		No. of pregnant females	Onset of labor (day)	Duration of labor (hour)	Postnatal survivors per total births (%)
Male	Female				
<b>Otr<sup>+/+</sup> × Otr<sup>+/+</sup></b>		11	19.1±0.1	3.8±0.4	96
<b>Otr<sup>-/-</sup> × Otr<sup>+/+</sup></b>		10	19.2±0.1	4.8±0.9	92
<b>Otr<sup>+/+</sup> × Otr<sup>-/-</sup></b>		10	19.2±0.1	4.8±0.9	0
<b>Otr<sup>-/-</sup> × Otr<sup>-/-</sup></b>		13	19.3±0.1	3.2±0.2	0

The morning of detection of the copulation plug was designated as day 0.5 of pregnancy. The data represents mean ± SEM.

**Table3 Summary of parturition in  $Fp^{-/-}$ ,  $Ot^{-/-}$ ,  $Otr^{-/-}$ ,  $Fp^{-/-}/Ot^{-/-}$  and  $Fp^{-/-}/Otr^{-/-}$  mice**

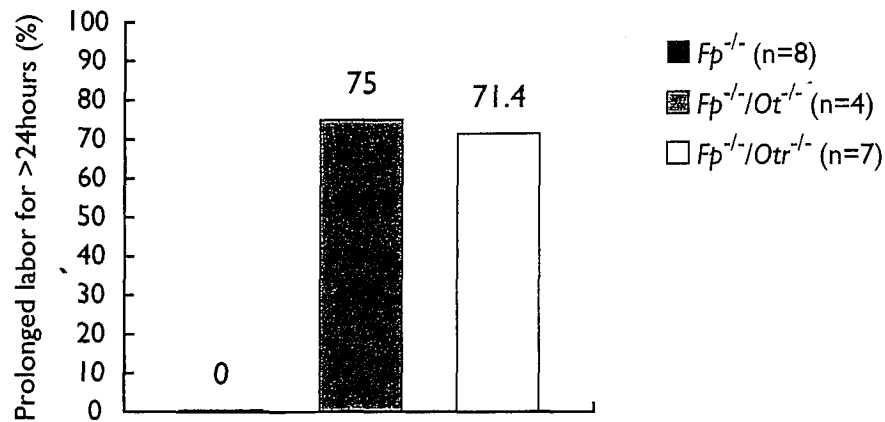
Maternal genotype	No. of pregnant females	Onset of labor (day)	Duration of labor (hour)	Average litter size
<b>wild-type</b>	6	19.4±0.1	3.9±0.7	8.8±0.6
<b><math>Fp^{-/-}</math></b>	8	22.2±0.4	—*	—*
<b><math>Ot^{-/-}</math></b>	5	19.4±0.1	4.1±0.8	7.2±0.9
<b><math>Otr^{-/-}</math></b>	13	19.3±0.1	4.6±0.7	8.2±0.5
<b><math>Fp^{-/-}/Ot^{-/-}</math></b>	7	21.7±0.3	—*	—*
<b><math>Fp^{-/-}/Otr^{-/-}</math></b>	7	22.8±0.3	—*	—*

The morning of detection of the copulation plug was designated as day 0.5 of pregnancy. The data represents mean ± SEM. \*The data could not be determined.

**Table4 Summary of RU486-induced parturition in  $Fp^{-/-}$ ,  $Fp^{-/-}/Ot^{-/-}$  and  $Fp^{-/-}/Otr^{-/-}$  mice**

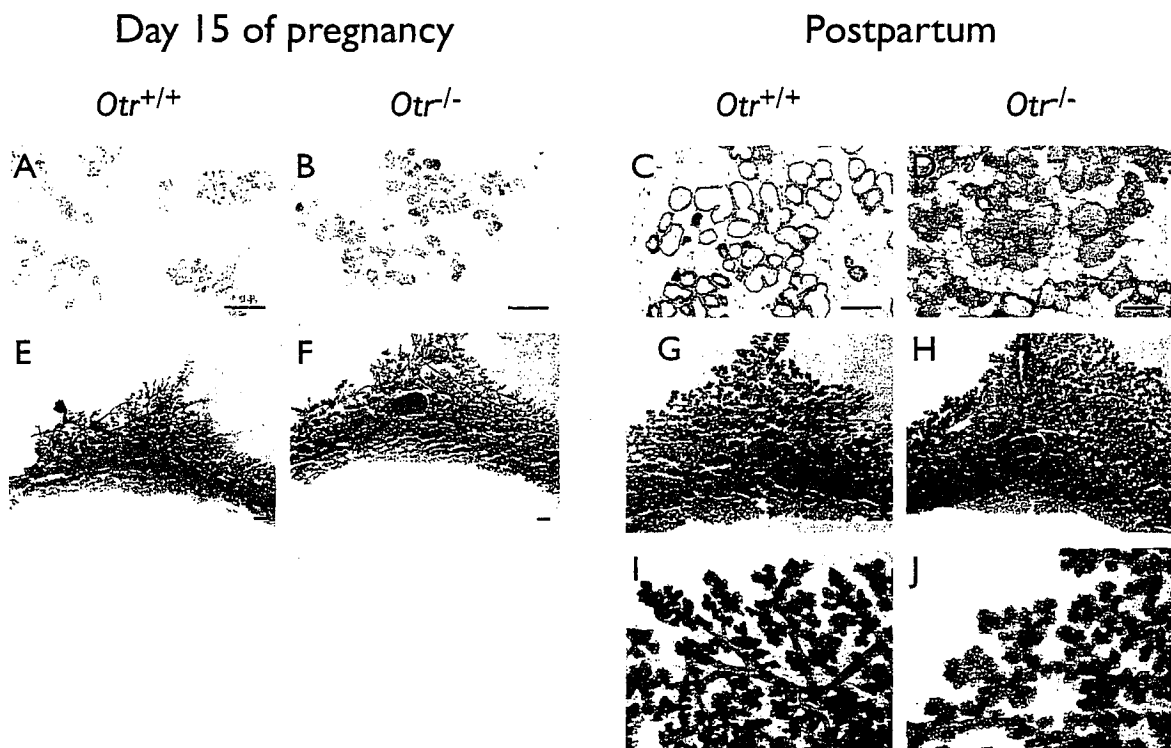
Maternal genotype	No. of pregnant females	Administration of RU486	Onset of labor (day)	Duration of labor (hour)	Average litter size
<b><math>Fp^{-/-}</math></b>	8	—	22.2±0.4	—*	—*
	8	+	19.7±0.0	3.3±0.4	6.8±0.5
<b><math>Fp^{-/-}/Ot^{-/-}</math></b>	7	—	21.7±0.3	—*	—*
	4	+	19.8±0.1	prolonged	7.5±0.5
<b><math>Fp^{-/-}/Otr^{-/-}</math></b>	7	—	22.8±0.3	—*	—*
	7	+	19.7±0.1	prolonged	6.9±0.5

The morning of detection of the copulation plug was designated as day 0.5 of pregnancy. The data represents mean ± SEM. \*The data could not be determined.



**Figure3 Duration of labor induced by progesterone receptor antagonist RU486 in  $Fp^{-/-}$ ,  $Fp^{-/-}/Otr^{-/-}$  and  $Fp^{-/-}/Otr^{-/-}$  mice.**

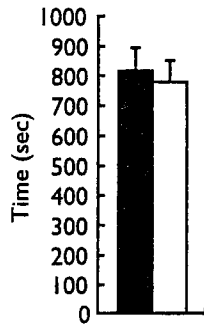
RU486 was injected subcutaneously (225 $\mu$ g) into  $Fp^{-/-}$ ,  $Fp^{-/-}/Otr^{-/-}$  and  $Fp^{-/-}/Otr^{-/-}$  mice on day 19 of pregnancy. The percentage of females with prolonged labor over 24 hours is shown,



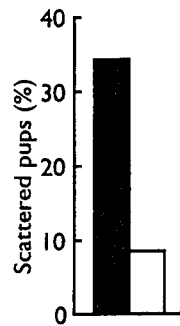
**Figure4 Histological analysis and whole mounts of  $Otr^{+/+}$  and  $Otr^{-/-}$  females mammary glands at day 15 of pregnancy and postpartum.**

Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (A-D) and whole mounts were stained with Carmine Alum (E-J). Pannels I and J are higher magnifications of each G and H. Scale bars represent 100  $\mu$ m (A-D,I and J) and 1 mm (E-H).

**Time spent crouching behavior**



**Percentage of scattered pups**



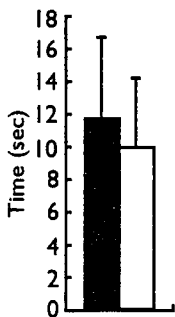
■ *Otr*<sup>-/-</sup> (n=9)  
□ *Otr*<sup>+/+</sup> (n=10)

**Figure5 Observation of postpartum *Otr*<sup>-/-</sup> and *Otr*<sup>+/+</sup> females before tests for maternal behavior.**

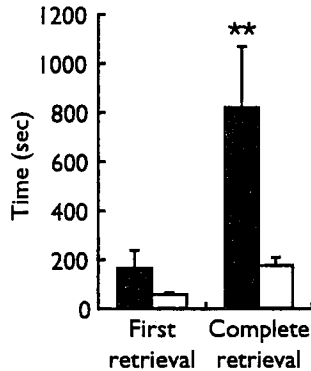
Each female (10-15 weeks old) was observed for 20 minutes, and time crouching over pups and percentage of newborns scattered was recorded.

The data represents mean  $\pm$  SEM.

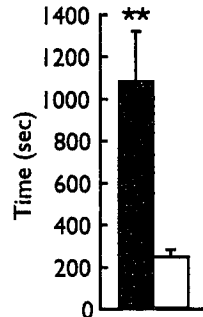
**Latency to sniff**



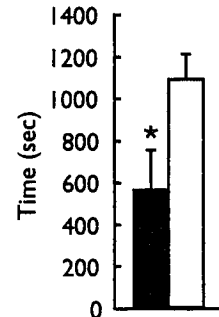
**Latency of pups retrieval**



**Latency of crouching over all three pups**



**Time spent crouching over all three pups**

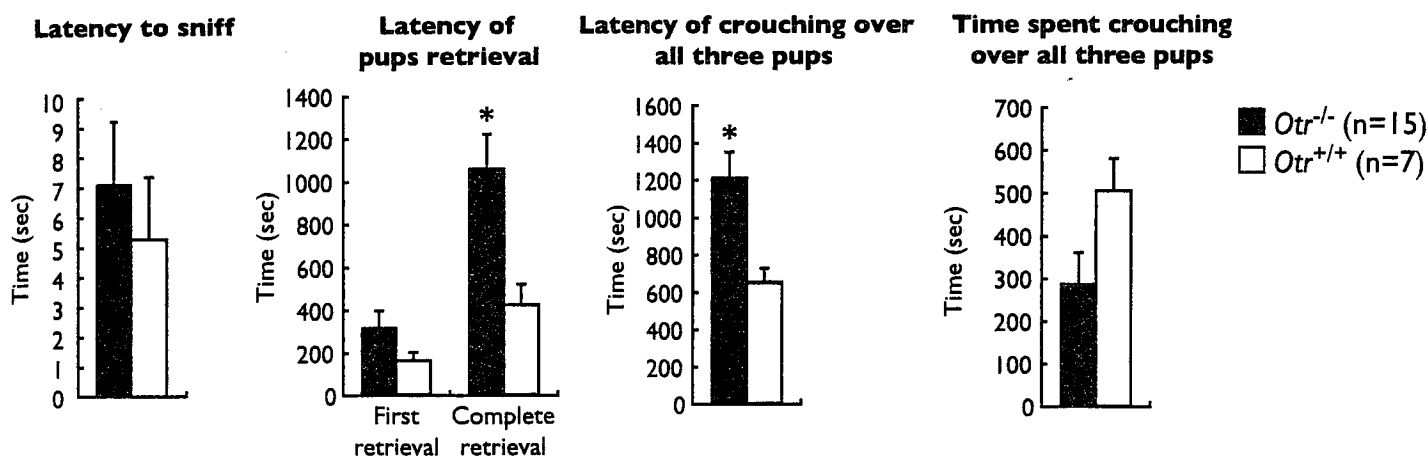


■ *Otr*<sup>-/-</sup> (n=9)  
□ *Otr*<sup>+/+</sup> (n=10)

**Figure6 Tests for maternal behavior in *Otr*<sup>-/-</sup> and *Otr*<sup>+/+</sup> postpartum females.**

Three newborn pups (1-3 days old) were placed in different areas of the cage and the following behaviors were scored for 30 minutes: latency to retrieve each pup; latency of crouching over pups in the nest; and time crouching over all three pups in the nest. Failure to retrieve or crouch was assigned as 30 minutes, the length of the observation period.

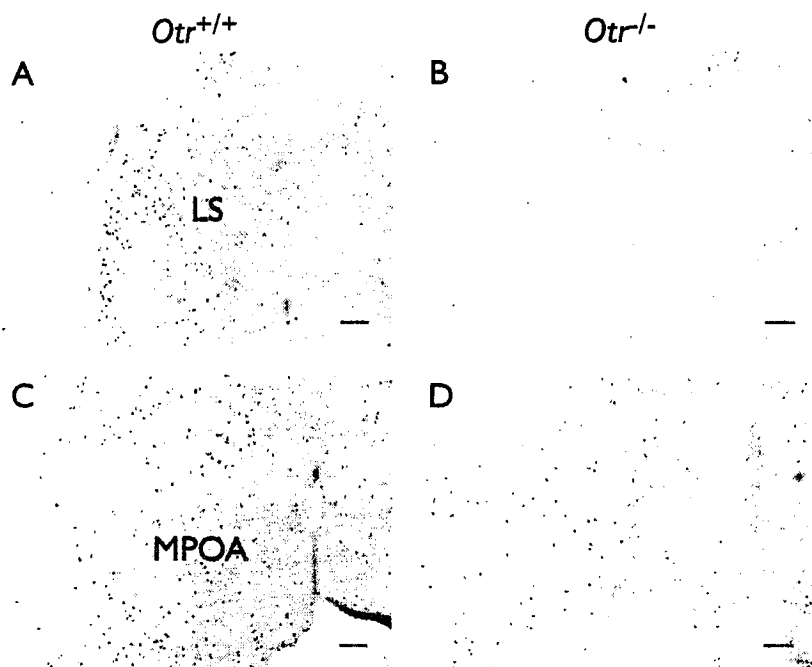
The data represents mean  $\pm$  SEM and were analyzed by the Mann-Whitney U-test. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  for mutant compared with wild-type.



**Figure7 Tests for maternal behavior in *Otr*<sup>-/-</sup> and *Otr*<sup>+/+</sup> virgin females.**

The behavior of each female (7-9 weeks old) was observed as described in Fig.6.

The data represents mean ± SEM and were analyzed by the Mann-Whitney U-test. \**P* < 0.05 for mutant compared with wild-type.

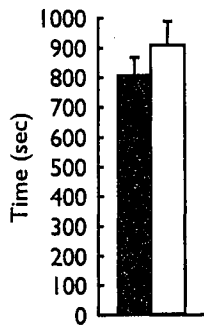


**Figure8 Neural activation after exposure to pups in *Otr*<sup>-/-</sup> and *Otr*<sup>+/+</sup> virgin females.**

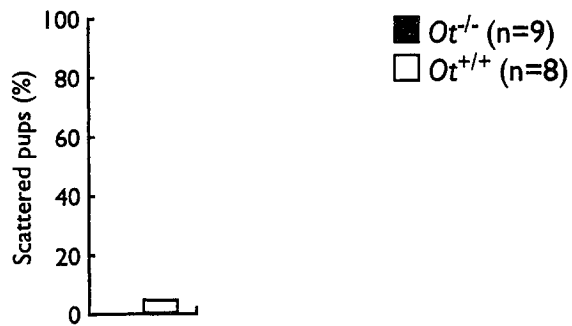
Representative photomicrographs showing c-Fos-immunoreactive cells in *Otr*<sup>+/+</sup> (A and C) and *Otr*<sup>-/-</sup> (B and D) virgin females in the lateral septum (LS) (A and B) and the medial preoptic area (MPOA). Each female was exposed to three newborn pups (1-3 days old) for 5 minutes. After the exposure, pups were removed and each female was left undisturbed for 75 minutes. Each female was then anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde. The perfused brains were subsequently removed and their sections were cut and processed for detection of the c-Fos.

Scale bars represent 100 μm.

**Time spent crouching behavior**



**Percentage of scattered pups**

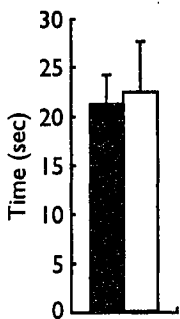


**Figure9 Observation of postpartum  $O_t^{-/-}$  and  $O_t^{+/+}$  females before tests for maternal behavior.**

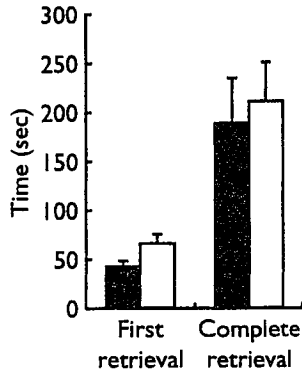
Each female was observed as described in Fig.5.

The data represents mean  $\pm$  SEM.

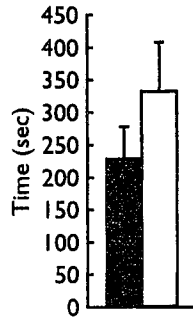
**Latency to sniff**



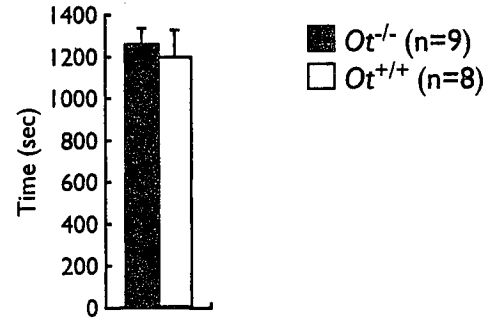
**Latency of pups retrieval**



**Latency of crouching over all three pups**



**Time spent crouching over all three pups**

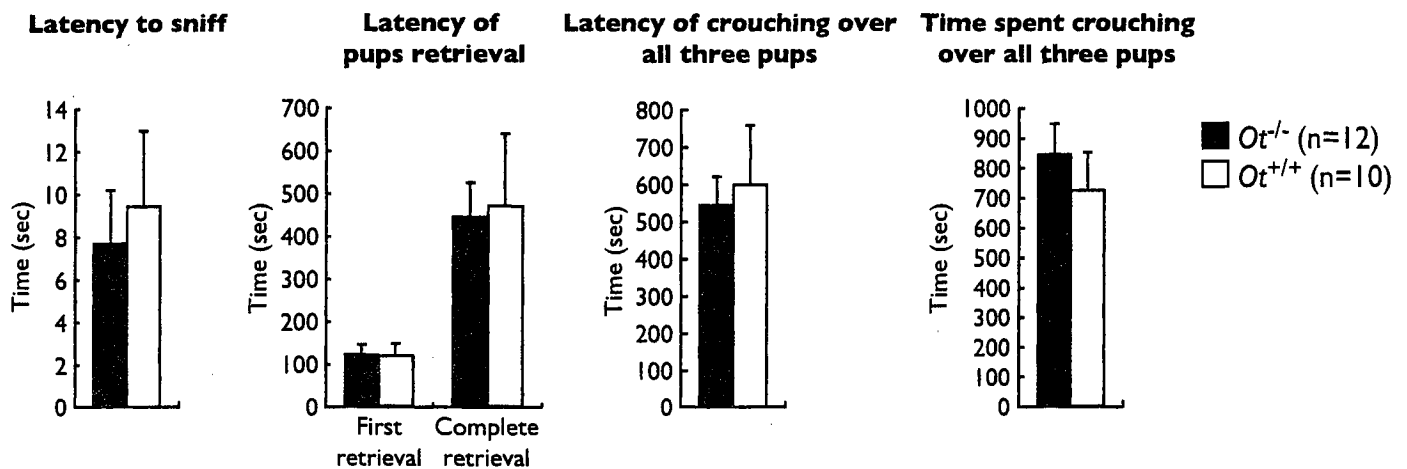


**Figure10 Tests for maternal behavior in  $O_t^{-/-}$  and  $O_t^{+/+}$  postpartum females.**

The behavior of each female was observed as described in Fig.6.

The data represents mean  $\pm$  SEM and were analyzed by the Mann-Whitney U-test.

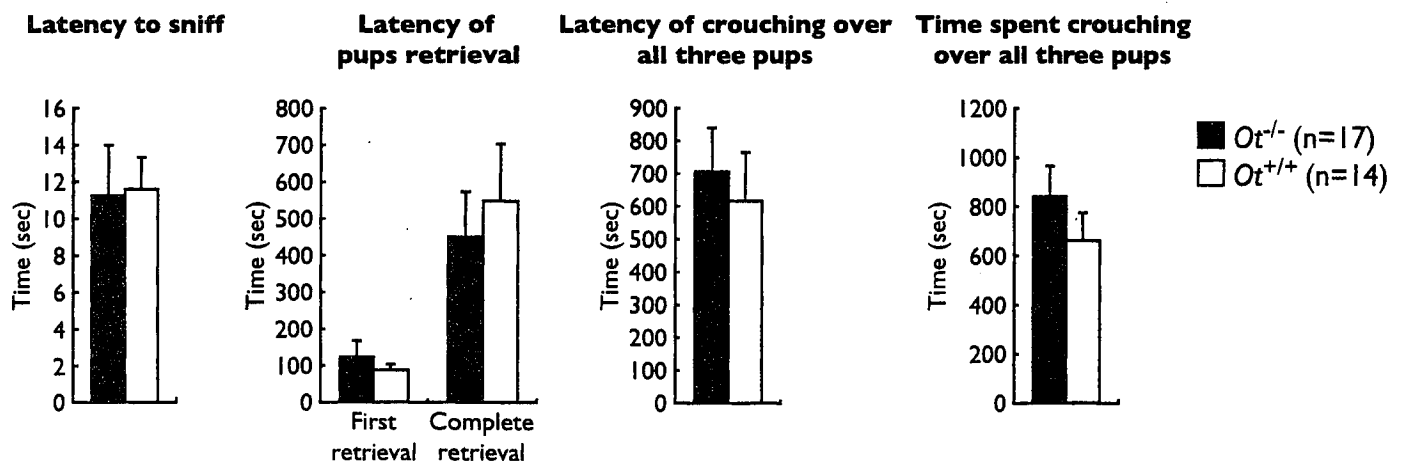




**Figure 1 Tests for maternal behavior in  $Ot^{-/-}$  and  $Ot^{+/+}$  virgin females.**

The behavior of each female was observed as described in Fig.6.

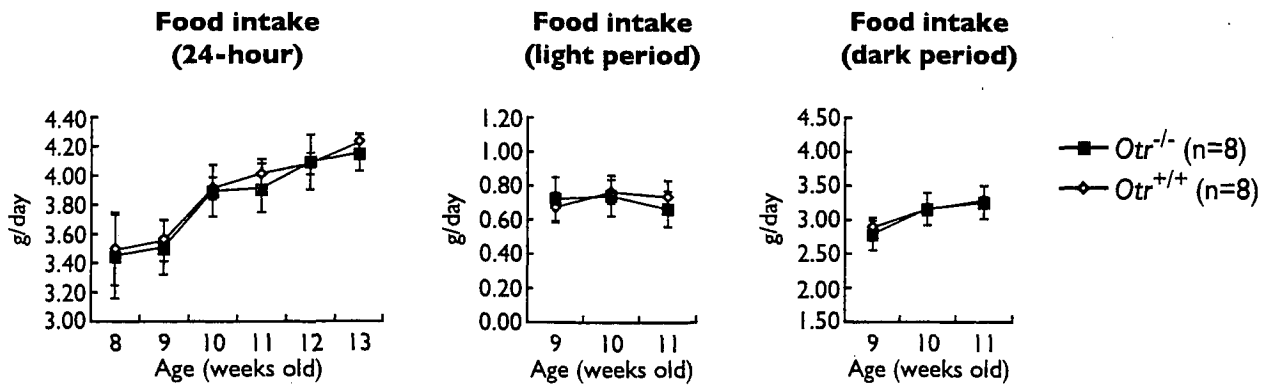
The data represents mean  $\pm$  SEM and were analyzed by the Mann-Whitney U-test.



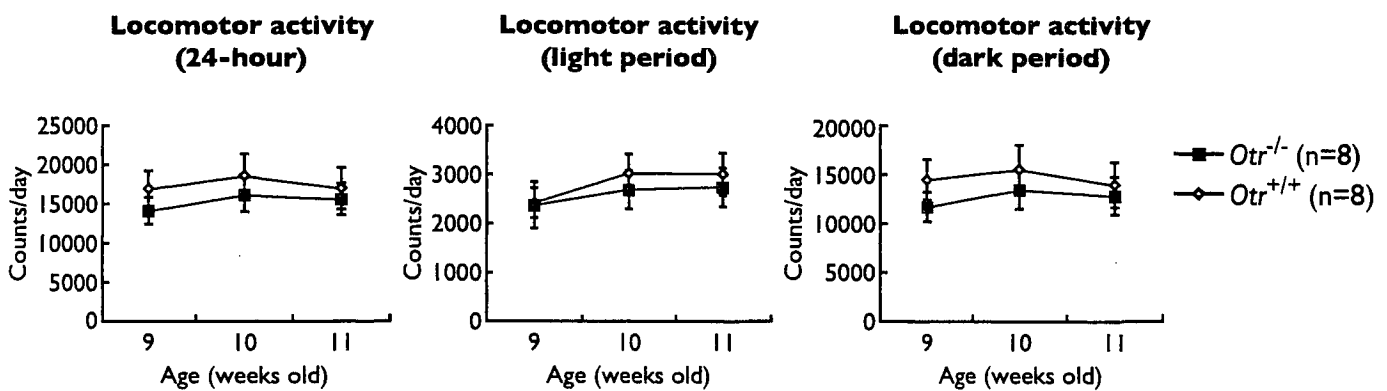
**Figure 2 Tests for maternal behavior in  $Ot^{-/-}$  and  $Ot^{+/+}$  virgin females from intercrosses of each of  $Ot^{-/-}$  and  $Ot^{+/+}$  mice and fostering by C57BL/6J female mice.**

The behavior of each female was observed as described in Fig.6.

The data represents mean  $\pm$  SEM and were analyzed by the Mann-Whitney U-test.



**Figure 13 Food intake and their circadian rhythm in  $Otr^{-/-}$  and  $Otr^{+/+}$  males.** Food intake was measured every week at 8, 12 and 13 weeks old and daily food intake was recorded automatically every 15 minutes during 9-11 weeks old. The data represents mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Student's t-test.



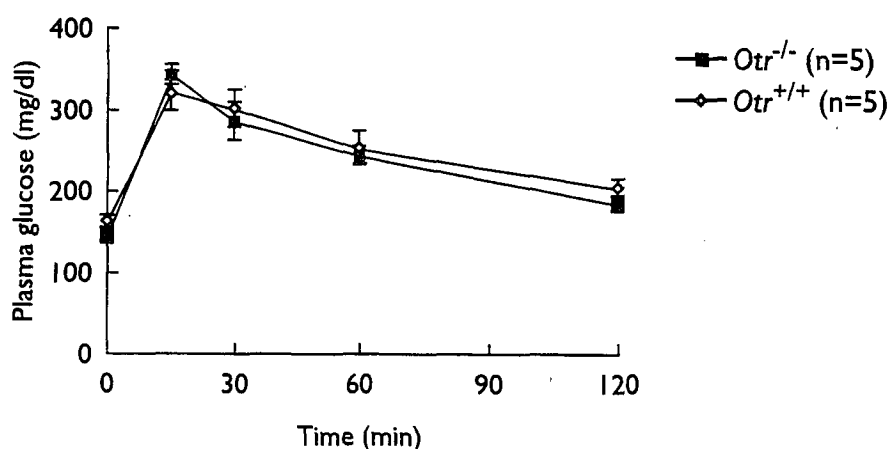
**Figure 14 Locomotor activity and their circadian rhythm in  $Otr^{-/-}$  and  $Otr^{+/+}$  males.** Locomotor activity was recorded automatically every 15 minutes during 9-11 weeks old. The data represents mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Student's t-test.

**Table 5 Metabolic parameters in 20-weeks-old  $Otr^{-/-}$  and  $Otr^{+/+}$  male mice**

Metabolic parameters	$Otr^{-/-}$ (n=9)	$Otr^{+/+}$ (n=9)
Glucose (mg/dl)	216±10	195±12
Triglycerides (mg/dl)	196±17	175±17
Cholesterol (mg/dl)	132±11	128±6
Free fatty acids (mEq/l)	1.09±0.12	0.94±0.14

Blood samples were collected from the retro-orbital sinus in the fed state between 10:00 AM and 12:00 PM. Plasma was prepared, followed by measurement of glucose, triglycerides, cholesterol and free fatty acids in blood.

The data represents mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Student's *t*-test.



**Figure 15 Oral glucose tolerance test in 20-week-old  $Otr^{-/-}$  and  $Otr^{+/+}$  males.**

20-week-old mice fasted for 16 hours were given oral glucose (2g/kg) load. Blood samples were collected from the retro-orbital sinus before (0 min) and 15, 30, 60 and 120 minutes after glucose administration. Plasma was prepared, followed by measurement of glucose level in blood.

The data represents mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Student's *t*-test.

## 原著論文

Takayanagi, Y., Yoshida, M., Bielsky, I.F., Kawamata, M., Ross, H.E., Onaka, T., Matzuk, M.M., Yanagisawa, T., Kimura, T., Young, L.J., and Nishimori, K.

Pervasive social deficits, but normal parturition in oxytocin receptor-deficient mice.

(In preparation)

Takayanagi, Y., Yoshida, M., Sato, K., Kimura, T., Sugimoto, Y., and Nishimori, K.

The mechanism of parturition studied with oxytocin receptor/prostaglandin  $F_{2\alpha}$  receptor double knockout mice.

(In preparation)

Takayanagi, Y., Yoshida, M., Onaka, T., Young, L.J., and Nishimori, K.

Oxytocin receptor but not oxytocin is essential for maternal nurturing behavior in mice.

(In preparation)

## 参考論文

西森克彦, 川又理樹, 高柳友紀

遺伝子欠損マウスによるオキシトシン・オキシトシン受容体システムの機能解析

日本農芸化学会誌 ミニレビュー 76, 1086-1089 (2002)

Kawamata, M., Mitsui-Saito, M., Kimura, T., Takayanagi, Y., Yanagisawa, T., and Nishimori, K.

Vasopressin-induced contraction of uterus is mediated solely by the oxytocin receptor in mice, but not in humans.

*Eur. J. Pharmacol.* 472, 229-234 (2003)

Ogita, K., Kimura, T., Takayanagi, Y., Kawamata, M., Shimoya, K., Koyama, M., Nishimori, K., and Murata, Y.

Innate immunity related molecules compensate oxytocin-oxytocin receptor (OTR) system at parturition of OTR deficient mouse.

(In preparation)

## 論文審査結果要旨

### OTR 遺伝子欠損マウス作製

オキシトシン (OT) は脳内で合成されて下垂体後葉から血中に放出されるが、脳内にも分泌されてこれが行動制御等に働く。GPCR 型の OT 受容体 (OTR) は雌雄生殖器官、脳、腎臓、心臓、脂肪組織などに発現し、分娩時の子宮収縮や乳腺平滑筋による乳汁射出、その他の雌雄生殖機能、生殖行動、母性行動、社会行動 (個体識別記憶、集団形成など)、摂食行動、ストレス反応等を制御するとされる。生体での OTR 機能を解明する為、発表者は *Otr* 遺伝子欠損マウス (*Otr*<sup>-/-</sup>) を作製した。雌雄 *Otr*<sup>-/-</sup> は正常に生まれ生存したため、これらを用いて OT/OTR システムの役割を個体レベルで詳細に解析した。

### OTR の生殖機能に果たす役割

予想外にも、*Otr*<sup>-/-</sup> では雌の卵形成、性周期、排卵、受精、着床、妊娠、雄の精子形成、射精、雌雄の性行動において *Otr* 遺伝子欠損の影響は見られず、分娩にも異常は認められなかった。*Otr*<sup>-/-</sup> の分娩に関して他因子による相補の可能性を考えて子宮収縮因子の PGF2 $\alpha$  に着目し、PGF2 $\alpha$  受容体 (FP) と OT の両遺伝子欠損マウス (*Fp*<sup>-/-</sup> · *Otr*<sup>-/-</sup>)、FP と OTR の両遺伝子欠損マウス (*Fp*<sup>-/-</sup> · *Otr*<sup>-/-</sup>) 二種を作製した。この結果、FP と OT、OTR は分娩開始誘導には必須でないが、分娩時の子宮筋収縮に相補的に働き、正常に分娩を終了させるために必須である事が示唆された。一方で、雌 *Otr*<sup>-/-</sup> より産まれた仔は母親の授乳不全により出産後速やかに死亡するが、*Otr*<sup>-/-</sup> の乳腺の発達や乳汁形成は正常であるため、これは乳腺筋上皮細胞の収縮異常に起因する事が示された。

### OTR の母子親和行動における機能

OT/OTR はマウスの母性行動には必要ないとされてきたが、出産後 *Otr*<sup>-/-</sup> の母性行動に異常が見られたため、解析を行った。出産後 *Otr*<sup>-/-</sup> では retrieving (仔を口にくわえて巣に連れ戻す)、crouching (哺乳や保温のために仔を腹の下に抱える) に異常が認められた。未経産 *Otr*<sup>-/-</sup> も同様に母性行動異常を見せたため、OTR は妊娠・分娩時の生理学的変化によらず、マウスの母性行動に重要である事が明らかとなった。また、ラットの母性行動に重要とされ OTR が発現する脳領域 (LS, MPOA) において、*Otr*<sup>-/-</sup> では母性行動誘発時の神経細胞の興奮性が低下しており、これらの領域で OTR が役割を果たす可能性が示唆された。一方、*Otr*<sup>+/-</sup> 同士の交配による仔 (*Otr*<sup>-/-</sup>) は出産後、未経産共に正常な母性行動を示した。母親の OT が胎盤を通じて胎児に作用した可能性を考え、*Otr*<sup>-/-</sup> 同士の交配から得た *Otr*<sup>-/-</sup> の母性行動を検討したが正常であり、OTR を活性化する他のリガンドの存在が推定された。更に Young 博士との共同研究で、母親との隔離時に仔が発する超音波発声について *Otr*<sup>-/-</sup> 仔で有意に少ない事が確認された。これらより、OTR は母子親和関係に極めて重要な因子と推定された。

### *Otr*<sup>-/-</sup> の示す雄特異的肥満

*Otr*<sup>-/-</sup> は雄特異的に加齢に伴う内臓脂肪型肥満を呈した。そこで、*Otr*<sup>-/-</sup> の肥満の原因と生活習慣病危険因子である内臓脂肪蓄積の影響について解析した。*Otr*<sup>-/-</sup> の摂食行動、活動量についてはその概日リズムを含めて異常はなく、これらが肥満の原因ではない事を確認した。また、血中の血糖値、トリグリセライド、コレステロール、遊離脂肪酸の値や耐糖能は正常で、*Otr*<sup>-/-</sup> は内臓脂肪型肥満を示すが糖・脂質代謝機能に顕著な異常を示さない事が明らかとなった。